

ヒツジ血球およびヤギ血球に対する 免疫学的寛容の検討

—特に正常抗体との関連性について—

金沢大学結核研究所病態生理部(主任：西東利男教授)

鷹 西 道 雄

(受付：昭和41年2月17日)

緒 言

Medawar¹⁾以来 Acquired immunological tolerance (AIT) に関する研究は数多く行なわれ、その成立機序に関しても多くの考察が加えられ、Burnet²⁾あるいは Szilard³⁾の仮説が提出されていることは周知のところである。しかしながらある動物においてあらゆる抗原に対し同程度に AIT が成立するのではなく、抗原によってその成立に難易のあることもよく知られている事実である。

Dixon⁴⁾らは Felton⁵⁾の観察を考慮に入れて Immunological paralysis (IP) をじゃっ起するためには抗原が持続的に体内に存在することが必要であるとし、一般に成熟時には新生時に比べて Immune response によらない抗原消去が大きいこと IP を生じたいと論じている。ことに異種血球に対する AIT 成立の有無についてみると、Bauer⁶⁾ら是否定的成績がえられたと報じているが、抗原量を多くすれば成り立つ可能性のあることをほのめかし、Mitchison⁷⁾は血球の AIT はいずれも partial で complete でないことを観察し、その原因

として、抗原で前処置する際、対応する抗体を投与しておくこと AIT の成立しがたいことから、異種血球では新生時に有する異種抗体のため抗原の持続的存在が困難なことによるのではないかと推定している。

ところで血球はきわめて強力な複雑抗原である。その異種抗体もいずれかの単位抗原と対応するであろう。今日まで血球の AIT をこのような単位抗原に解析して行なわれたものはない。よって著者はヒツジおよびヤギ血球を用いて、さきに一柳⁸⁾によって報告された Forsman 抗原、両種血球に共通な Forssman 抗原以外の抗原 (B) およびそれぞれに個有な抗原 (それぞれ S および G) に対する AIT の成立いかんを検討した。その結果動物の成熟過程において発生するいわゆる正常抗体—出生後 Tolerance injection をうける時存在しても、少なくとも一に対応する抗原には AIT が成立しがたいのであらうと考察される成績がえられた。

以下はその概要である。

実験材料ならびに実験方法

1. 動物； 白色健常ウサギよりえられた子ウサギを分娩直後より使用に供した。

2； 抗 原；

i) ヒト血球： AM Rh (+) および BN Rh (-)

本論文の要旨の一部は第15回日本細菌学会北陸地方部集会上において発表した。

の常にそれぞれ同一人からの血球を使用した。ACD 液中に採取された血液を、使用時食塩水で繰り返し充分洗浄した後所要濃度生食水浮遊液として用いた。なお注射には AM Rh (+) 血球を、反応には両血球を用いた。

ii) ヒツジ血球およびヤギ血球：それぞれほぼ同量の alsever 液中に採取し、生食水で充分洗浄した後、所要濃度生食水浮遊液として用いた。

iii) Forssman 抗原：モルモットを出血致死させ、摘出した腎を細切し、流水中に一夜放置した後秤量し、その5倍量の生食水を徐々に加えながらホモジナイザーにかけ一夜氷室においた後遠

心、その上清を用いた。

3. 抗原の注射；各実験項目のところで述べる。

4. 反応術式；

1) 血球凝集反応

2) 溶血反応

3) Antiglobulin test

4) Trypsinized 血球の凝集反応

5) 膠質溶液を希釈液とした凝集反応

6) Direct conglutination test

はすべて一柳⁹⁾の記載に準じて行なった。

5. 略記名；Forssman 抗原および Forssman 抗体はそれぞれ F 抗原、および F 抗体と略記。

実験成績

I. 成熟および新生ウサギ血清とヒト血球、ヒツジ血球およびヤギ血球との血清学的反応：

表1はその成績を一括したものである。この表から明らかに次のようなことが観察される。すなわち成熟ウサギ血清はヒト血球およびヒツジ血球と溶血および食塩水内凝集反応を呈する。しかしながら新生ウサギ血清はヒツジ血球とは同様両反応を呈するが、ヒト血球とはこの反応を呈しないのみならず、Coombs reaction, direct conglutination reaction, trypsin 処置血球反応および膠質内反応などすべて陰性である。更に成熟および新生ウサギ血清ともにヤギ血球との反応はヒトおよびヒツジ血球との反応といささか趣を異にしている。まず溶血反応は陽性であるが、食塩水内凝集反応を示さない。しかし Coombs reaction, direct conglutination reaction および trypsin 処置血球反応はすべて陽性である。この成熟および新生ウサギ血清中のヒツジおよびヤギ血球との反応因子は F 抗体であって、ヒツジ血球とヤギ血球の間で被凝集性に差がみられるのは兩種血球における F 抗原の分布の相異によることをすでに一柳⁹⁾が報告している。

ところで親と子ウサギの血清の間で、ヒト血球に対しては反応性が異なり、一方ヒツジあるいはヤギ血球に対しては反応性が同一である原因は何か、これはヒツジあるいはヤギ血球と反応する F 抗体は胎生時に親より子に移行する

が、ヒト血球との反応因子は移行しないからであろう。表2は新生ウサギについて生後1週ごとに採取した血清とヒトおよびヒツジ血球との反応を示したものである。これによるとヒツジ血球溶血反応は生後週を追って弱くなり、3週より5週の間は陰性となるが、6週より再び出現しはじめ以後漸次強くなる。しかるにヒト血球との反応は出生直後の血清によってはじゃっ起されず、6週に至ってはじめて認められるようになり、以後漸次強くなる。このようにして F 抗体とヒト血球抗体は生後一定期間後特に人為的に抗原刺激を加えることなくして発生し、そのうち前者は胎生時、親より子に移行し、後者は移行しないことが明らかとなった。

ところで親および子ウサギ血清ともモル腎で吸収後はヒツジおよびヤギ血球と反応しなくなる。このことはヒツジおよびヤギ血球に存在する多くの抗原中の F 抗原以外の抗原に対する抗体は無処置ウサギにはないのであらうと推定させる。表3はヤギ血球を注射された親より生れたウサギの成長過程における抗ヤギ血球抗体の消長を示したものである。これで見ると親血清はヤギ血球溶血反応とともに凝集反応を呈する。F 抗体のみであれば凝集反応を示さないことは一柳がすでに報告しているところで、明らかに F 抗体以外の自然には保持しない抗 G および抗 S の産生が認められる。しかもこの抗体は胎児に移行するが、生後日時の経過とともに

に減少し、ついに消失し、或熟に至るも抗原刺激がなければ発生しない。一方溶血反応の方に目を転ずると生後漸次弱くなり、7週を最低としてその後再び強くなる。これは親より子ウサギに移行したF抗体とG、S抗体が漸次減少してついに、消失するがその前後にF抗体の自然発生が開始されるからであろう。

以上述べてきたところから、ウサギにおいては、

1) 抗ヒト血球抗体は新生時に存在しないが、数週後自然発生しこのものはABO, MN, PおよびRhに対する抗体でないことは既知のところである。

2) ヒツジおよびヤギ血球に対する抗体のうち、F抗体は新生時に存在しているが2～3週間で消失し、更に2～3週後自然発生する。更に

3) ヒツジおよびヤギ血球中のB、SおよびGに対応する抗体は新生時に存在せず、その後自然発生も認められない。

ということが明らかとなった。このような前提条件を念頭においてヒト血球、ヒツジ血球およびヤギ血球に対する免疫学的寛容成立いかんの検討を行なった。

II. ヒト血球に対する免疫学的寛容

表4は前処置として出生当日1回だけ40%ヒトA型血球1mlを心臓内に注射し、そのうちの一部は39,41および43日目に、更に73,80および87日目に、他の一部には73,80および87日目におのおの10%ヒトA型血球1mlでchallengeを行なった成績を示したものである。これによると出生当日の処置はその後の抗ヒト血球抗体の自然発生にほとんど影響がないと推定されるし、また39日よりのfirst challengeで明らかな抗体価の上昇が認めらる。更に73日からのfirstおよびsecond challengeによって前者ではゆるやかに、後者では急速に抗体価が上昇し、しかし最終的にはほぼ同一程度となる。

表5は前処置として出生当日、5日および10日目におのおの40%ヒトA型血球1mlずつを心臓内に注射したものと、この前処置を行なわ

いものについて、41, 48および55日目におのおの10%ヒトA型血球1mlでchallengeを行ない、その後の抗体の産生を比較した成績を示したものである。ここでは前処置を行なったものではかえってchallenge後すみやかに抗体価の上昇が認められるような成績がえられたのであるが、最終抗体価は前処置を行なわなかったものと異なることはない。

表6は前処置として40%ヒトA型血球1mlずつを出生当日より3週間連日およびその後2週間毎週2回、合計35日間にわたって25回腹腔内に注射したものと、この前処置を行なわなかったものに対し、46, 53および60日目におのおの10%ヒトA型血球1mlでchallengeを行なった成績を比較対比したものである。これによると45日目すでに前処置のなかったものもほぼ1:32の抗体価を示し、前処置をうけたものもこれと全く差を示さない。またchallenge後の抗体価の上昇も両者間でほとんど同一である。以上述べた抗体価はAM Rh(+)およびBN Rh(-)血球のいずれを用いてもほぼ同じであって、AM Rh(+)血球注射によって種特異抗体が産生されたことが推定される。

さきにも述べたように成熟して自然発生するヒト血球種特異抗原に対する抗体にはAITが成立しがたいと思われる成績がえられたわけであるが、なお自然発生しない抗ABO, 抗MN, 抗Rhおよび抗Pなどの産生状態はどうだろうか、重要な研究課題として残されている。

III. ヒツジ血球に対する免疫学的寛容

表7は前処置として40%ヒツジ血球1mlずつ出生当日より3週間連日、およびその後2週間に4回、合計35日間にわたって25回腹腔内に注射したものと、この前処置を行なわなかった対照群に対し、46, 53および60日目におのおの10%ヒツジ血球1mlでchallengeして抗体の産生経過を比較した成績を示したものである。これでわかるように45日にはすでにヒツジ血球に対する抗体の自然発生が認められ、また前処置を行なったものにおいてはヒツジ血球抗体価はかなり高く、前処置によって抗体産生の招来されたことが窺われる。しかもchallengeによ

って前処置群では軽度、対照群では強度に抗体価の上昇があり、最終的には両群間でほとんど差が認められなくなる。ここで注目される点はヤギ血球凝集反応の消長である。すなわち前処置群および対照群とも challenge 前は陰性であるが、challenge 後は前処置群の低い抗体価に比べて対照群のそれはかなり高い。

このヤギ血球凝集素は正常抗体としては存在しないことはすでにⅠ項のところで述べたところであるが、この抗体は新生ウサギを対応抗原で前処置することによって成熟後同一処置をうけてもその産生が抑制される可能のあることを示している。

表 8 は更に前処置を多くし一出生後65日間に41回注射し、131, 138, 145 および 153 日目に challenge した成績を一括したものであるが、ここでも表 7 で示されたとはほぼ相似た結果が認められた。

Ⅳ. ヤギ血球に対する免疫学的寛容

前処置の期間及び抗原の投与量と challenge とをいろいろに組み合わせて多くの検討を行なったが、一定の結果はえられなかった。その中の代表的な実験成績を表 9 および表 10 に示した。

表 9 は比較的強い前処置を行なったものの成績である。すなわち出生当日より連日30回、その後35日間に10回、合計65日間にわたって40回毎回40%ヤギ血球 2 ml を腹腔内に注射し、95日目から1週間隔で3回、各回10%ヤギ血球 1 ml で challenge injection を加えて抗体産生を追究した。これによると前処置をしない対照群の challenge 前の抗体価に比べ、前処置群のそれはいずれもかなり高く、かつ以後の challenge による抗体価の上昇は軽度であって、すでに challenge 前にほぼ最高に近い抗体産生が認められた。ただ前処置群の中に、ヤギ血球凝集反応では challenge 前、対照群とはほぼ同程度に低い抗体価を示すものもあったが、challenge 後は対照群と全く差を示さなかった。

表 10 は出生当日より3週間連日、その後5週間に14回、合計55日間にわたって35回、毎回40

%ヤギ血球 2 ml を腹腔内に注射、110, 117 および 124 日目に10%各ヤギ血球 1 ml で challenge したものの成績を示したものである。ここで表 9 でみられた成績と著しく異なる点はヤギ血球凝集反応における抗体価が終始低いことであって、おそらく前処置がその後の challenge によるヤギ血球凝集素産生を阻止するよう働いたのであろう。

なお最終 challenge 1 週後にえられた血清について吸収試験を行なった成績を表 11 にまとめた。これで見ると No. 1 ではヤギおよびヒツジ血球との反応因子はモルモット腎で完全に吸収され、No. 2 ではヤギおよびヒツジ血球に対する溶血活性はモルモット腎による吸収で大部分消失するが一部残存し、かつ凝集活性はほぼもとどおりであることがわかる。このことは、No. 1 では、F 抗体が、No. 2 では、F 抗体のほか、ヤギ血球、ヒツジ血球に対する抗体が存在することを示している。No. 2 のこの F 抗体でない抗体はヒツジ血球によって完全に除かれることから、ヤギおよびヒツジ血球に共通な抗原に対応するものであることが推定される。

Ⅴ. モルモット腎水抽出液を用いた F 抗原に対する免疫学的寛容の検討

ヒツジおよびヤギ血球に対する免疫学的寛容の検討では、F 抗原に対してはほぼ成立しがたいと考えられる結果がえられた。しかし血球粒子として投与されているので、ここでは前処置および challenge ともモルモット腎水抽出液を用いて検討を行なった。すなわち出生当日より3週間連日、その後2週間に4回、合計35日間にわたって25回、毎回 2 ml を腹腔内に注射、75 および 82 日目に各 2 ml で challenge した。表 12 はその結果を示したものである。これによると48日目では前処置を行なわない対照群ではいまだ F 抗体の産生は認められないが、前処置群ではすでにその産生が明らかである。64日では対照群でも F 抗体が認められるに至るがなお前処置群より抗体価は低い。challenge 後は両群においてともに抗体価の上昇があり、最終的には両群間に差を認めない。

総括ならびに考案

血球に対する AIT を検討したものは今日までにその数少なしとしない。しかしその成績は実験方法の差もあって必ずしも一定ではない。すなわち Ambrus⁹⁾ はウサギ血球をニワトリに, Bauer¹⁰⁾ はヒツジ血球をラットに, Burnet¹¹⁾ はヒト血球をニワトリに注射しても AIT が招来されなかったと報告し, 一方 Owen¹²⁾, Simonsen¹³⁾ らはヒト血球に対しラット, ウサギあるいはニワトリが, Hasek¹³⁾ はシチメンチョウ血球に対しニワトリが, Calabresi¹⁴⁾ はヒト血球に対しラットが, Nossal¹⁵⁾ はヒツジ血球およびマウス血球に対しラットが, Mitchison⁷⁾ はシチメンチョウおよびヒト血球に対しニワトリが AIT を示したと報告している。しかしながら AIT の成立を認めているものでもいずれも partial AIT にとどまり complete AIT は招来されないとしており, また AIT の成立を否定しているものの中にもその成績を詳細にみると partial AIT が成立しているのではないと思われるものがあって, 異種血球に対しても程度の差はあるが, partial AIT は招来されるといえるようである。

しかしこれまでの実験では血球を全体として一つの抗原とみて検討しているのであるが, ここで考慮すべきは血球が多くの単位抗原の集合体であって, この個々の単位抗原によって AIT 成立に難易があるのではないかということであって, この点は今日に至るまでなお未検討のまま残されている。そこで今回はこの問題解明の一助としてヒツジ血球あるいはヤギ血球対ウサギで検討を行なった。この両種の血球は F 抗原, F 抗原以外の共通抗原(B)更に両種血球の特異抗原(それぞれ S 抗原および G 抗原)を有しているので, それらに対する AIT 成立の有無, 程度を解析的に観察したわけである。その結果 F 抗原に対する AIT の成立はきわめて困難であるが, B, S および G 抗原に対しては時には成立することが知られた。

さてウサギでは成長過程において F 抗体を自

然発生し, この F 抗体は親より胎児に移行する。新生児の有する F 抗体は生後 3 週頃まで存在する。B 抗体, S 抗体および G 抗体は新生児に存在しない。Mitchison⁷⁾ も指摘しているように前処置をうける時保有している抗体は対応する抗原を不活性化し AIT 招来効果を減殺すると考えられるから, F 抗原に対する AIT は成立しがたく, B, S および G 抗原に対する AIT はこれより容易に成立しうるかもしれないとする考え方には根拠がある。しかしヒト血球—おそらく血球種特異抗原—に対しては新生児血清はなんら抗体活性を発揮しないにもかかわらず AIT は成立しがたい。ここに AIT の成立しがたい F 抗原とヒト血球種特異抗原, 成立しうる B, S および G 抗原についてみると明瞭に異なる次の点が注目される。すなわち F 抗体およびヒト血球抗体は生後 6 週頃より自然発生し, B, S および G 抗体はついに自然発生をみないことである。

いわゆる正常抗体がなんら抗原刺激を受けずに自然発生したものであるとすると, これはある細胞群の産生する Globulin でこれが偶然抗体活性を有すると考えられ, その細胞群は個体の発生過程において必然的に発生するよう遺伝的に決定づけられているわけであり, 一方この抗体がきわめてわずかな抗原刺激で容易につくられる免疫抗体であるとしても, 人為的消去に強く抵抗すること, 更に発生した抗体が抗原を不活性化して AIT の成立, 持続を阻止するよう働くことが予想されるわけである。

このような観点に立ってみるとウサギでは F 抗体およびヒト血球種特異抗原に対する抗体は出現しやすく, AIT は成立しがたいこと, ことに F 抗体は胎児に移行し新生児期の Tolerance injection を無効にし AIT の成立を一層困難にする可能性があることは理解にかたくない。AIT の成立機序については細胞レベルでの抗体産生の特異的阻止であろうと推定されており, いわゆる immunological paralysis もまた同じ機序によるとすると, 特に抗原投与

の時期を胎生期あるいは新生時に限る必要はなく central failure を導くにたる抗原の量が問題となるであろう。すなわち Bauer et al.⁹⁾ は前処置抗原量が AIT 成立への決定的要素であるとし, Mitchison⁷⁾ は抗体の passive transfer が AIT を中断するとし, Dixon⁴⁾ も AIT の持続には抗原が体内に存在しつづけることが必要であるとし, 小西ら¹⁶⁾ ¹⁷⁾ は抗原の booster injection が AIT を延長する現象を観察しており, これらのことは Dunsford¹⁸⁾ らの報告したヒトにおける血液キメラ現象とともに AIT 成立には前処置抗原量が重要であるとする考え方の妥当性を支持しているといえよう。

結

ヒツジあるいはヤギ血球を生直後より注射されたウサギは成熟後再び同血球の注射をうけると, その有する F 抗原に対しては, 生後前処置をうけなかったウサギにおけるとはほぼ同程度に抗体産生が認められるが, 両種血球に共通な F 抗原以外の抗原 (B) および両種血球にそれぞれ特有な抗原 (S および G) に対する抗体産生

今回の実験においてもいろいろの投与量について検討を加えたが, F 抗体の産生は抑制されなかった。しかし液状抗原と粒子状抗原ではその determinant group の数において後者がきわめて劣る点も指摘されており¹⁹⁾ 著者の用いた大量前処置量も液状抗原に比すべくもないかもしれない。しかしながらそれと同じ血球量によってヒツジ および ヤギ 血球の F 抗原以外の B, S あるいは G 抗原に対する AIT は成立しうることも実証され, AIT 成立のための抗原量は動物の種と抗原の相対的關係によって著しく左右されるのであらうと思われる。

論

は抑制される。その原因は, F 抗体は正常抗体として自然発生するもので, そのような種の特性は人為的抑制に抵抗し, 免疫抗体としてのみ発生する B, S および G 抗体は当該抗原の前処置によって比較的容易に抑制されることにありと推定される。

文

- 1) Medawar, P. B. et al. : Nature, 172, 603, 1953.
- 2) Burnet, F. M. : Brit. Med. J., 5153, 645, 1959.
- 3) Szilard, L. : Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 293, 1960.
- 4) Dixon, F. J. et al. : J. Exp. Med., 101, 245, 1955.
- 5) Felton, L. D. : J. Immunol., 61, 107, 1949.
- 6) Bauer, J. A. et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 92, 714, 1956.
- 7) Mitchison, N. A. : Immunolgy., 5, 341, 359, 1962.
- 8) 一柳兵蔵 : 金大結研年報, 22, 161, 1965.
- 9) Ambrus, J. L. et al. : cf. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99, 3, 1958.
- 10) Burnet, F. M. et al. : cf. Proc. Soci. Exp.

献

- Biol. Med., 99, 3, 1958.
- 11) Owen, R. D. : Proc. Roy. Soc. London S. B., 146, 8, 1956.
- 12) Simonsen, M. : Acta Path. Microbiol. Scand., 39, 21, 1956.
- 13) Hasek, K. : Proc. Roy. Soc. B., 146, 67, 1956.
- 14) Nossal, G. J. V. : Nature, 180, 1427, 1957.
- 15) Calabresi, P. et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99, 3, 1958.
- 16) 小西健一, 他 : 金大結研年報, 21, 287, 1964.
- 17) 小西健一, 他 : 金大結研年報, 22, 147, 1965.
- 18) Dunsford, I. et al. : Brit Med. J., 2, 81, 1953.
- 19) Talmage, D. W. et al. : J. Infect. Dis., 99, 246, 1956.

Table 1. Result of various reaction tests between erythrocytes from three species and sera from maternal and neonatal rabbits

Reaction \ Sera from	Antigen		Human erythrocytes		Goat erythrocytes		Sheep erythrocytes	
	Neonate	Mother	Neonate	Mother	Neonate	Mother	Neonate	Mother
Agglutination in saline	—	+	—	—	+	+	+	+
Coombs reaction	—	•	+	+	•	•	•	•
Direct conglutination	—	•	—	—	•	•	•	•
Agglutination of trypsinized erythrocytes	—	•	—	—	•	•	•	•
Agglutination in colloid	—	•	—	—	•	•	•	•
Hemolysis	—	+	+	+	+	+	+	+

Table 2. Change of sheep red cell hemolysing and human red cell agglutinating activities in the rabbit sera in the course of maturing

Reaction	Rabbit No.	Weeks after birth										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Hemolysis of sheep red cells	971	4	3	0 >	0 >	0 >	0	0	0	4	5	7
	972				0 >	0 >	2	2	6	6	6	6
	973				0 >	0 >	0 >	1	5	5	5	5 ₂₈
	975	4	3	0 >	0 >	0 >	4	4	4	5	6	7
	976				0 >	0 >	0	4	5	5	5	6
	977				0 >	0 >	0	2	4	6	7	7
	978				0 >	0 >	0	1	2	2	3	4
	971	0 >	0 >	0 >	0 >	0 >	2	4	5	5	6	6
Agglutination of human red cells	972	0 >	0 >	0 >	0 >	0 >	1	2	3	5	5	5
	973	0 >	0 >	0 >	0 >	0 >	1	2	3	4	4	6
	975	0 >	0 >	0 >	0 >	0 >	2	4	6	7	7	7
	976	0 >	0 >	0 >	0 >	0 >	1	1	3	3	3	7
	977	0 >	0 >	0 >	0 >	0 >	0	1	3	3	3	7
	978	0 >	0 >	0 >	0 >	0 >	0	1	3	4	4	4

Note ; Antibody titer is given as n in an expression of terminal serum dilution 1 : 2ⁿ showing antibody activity.

Table 3. Change of goat red cell hemolysing and hemagglutinating activity in the sera of rabbits in the course of maturing born from doe immunized with goat red cell

Antigen			Goat red cell																							
Reaction			Hemolysis														Hemagglutination									
Serum dilution (1 : 2 ⁿ);n			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Doe	day after delivery	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	0	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	0
Neonate	Days after birth	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0		3	3	3	3	3	3	2	2	1	0	
		10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0			3	3	3	3	3	3	2	1	0		
		14	3	3	3	3	3	3	3	2	0					3	3	3	3	3	2	1	0			
		21	3	3	3	3	3	3	2	0						3	3	3	3	1	0					
		28	3	3	3	3	3	2	0							3	2	2'	1	0						
		35	3	3	3	3	2	0								2'	1	0								
		42	3	3	2	0										0										
		49	3	3	2	0										0										
		56	3	3	3	1	0									0										
		63	3	3	3	2	1	0								0										
70	3	3	3	2	1	0								0												

Note ; 3 represents complete, 2 to 1 partial and 0 no hemolysis.

3 represents strong, 2 to 1 weak and 0 no hemagglutination.

Table 4. Hemagglutinin (anti-human A group blood) titer of animals pretreated on the day of birth and challenged later with human A group blood

Pretreatment	Challenge		Rabbit No.	Hemagglutinin titer (1:2 ⁿ) ; n						
Intracardial injection of human A red cells (40% ;1ml) on day after birth	Intravenous injection of human A red cells (20%, 1 ml) on days after birth			Days after birth	36 50 72			79 86 94		
0	39, 41 and	73, 80 and 87	361		0	7	3	7	8	9
	43		362		0	6	4	7	9	9
			363		0	5	3	6	9	9
			364		0	2	3	5	8	8
			365		0	3	2	6	8	9

Table 5. Hemagglutinin (anti-human A group blood) titer of animals pretreated on 0,5 and 10 days after birth and challenged later with human A group blood

Pretreatment	Challenge	Rabbit No.	Hemagglutinin titer (1:2 ⁿ) ; n			
Intracardial injection of human A red cells(40%, 1ml) on days after birth	Intravenous injections of human A red cells (10%, 1 ml) on days after birth		Days after birth			
			40	47	54	62
6,5 and 10	41, 48 and 55	411	< 2	4	7	7
		412	< 2	2	6	7
		413	< 2	7	7	7
		414	< 2	< 2	7	7
		415	< 2	< 2	7	7

Table 6. Hemagglutinin (anti-human A group blood) titer of animals pretreated 25 times during 35 days after birth and challenged later with human A group blood

Pretreatment	Challenge	Rabbit No.	Hemagglutinin titer (1:2 ⁿ) ; n		
			Days after birth		
Intraperitoneal injection of human A red cells (40%, 1 ml) on days after birth	Intravenous injection of human A red cells (10%, 1 ml) on days after birth		45	53	67
0 to 20 ; every day 22 to 35 ; 2 times weekly total 25 times	46, 53 and 60	341	5	10	10
		342	5	9	10
		343	5	9	9
		344	4	9	10
		345	5	8	12
		346	5	9	9
		347	6	10	10
		348	5	10	10

Table 7. Antibody titer to sheep and goat red cells of animals pretreated 25 times during 35 days after birth and challenged later with sheep red cells.

Pretreatment	Challenge	Rabbit No.	Antibody titer (1:2 ⁿ) ; n																			
			Anti sheep red cell							Anti goat red cell												
			Hemolysin			Agglutinin				Agglutinin												
			Days after birth			45	53	60	67	74	81	45	53	60	67	74	81					
Intraperitoneal injection of sheep red cells (40%, 2 ml) on days after birth	Intravenous injection of sheep red cells (10%, 1 ml) on days after birth	1		11	11	12	12	11	11	9	9	9	9	8	0	0	0	0	0	0		
		2		11	11	12	11	10	10	8	8	8	9	9	9	0	0	0	2	2	1	0
		3		11	13	13	12	11	11	8	9	9	9	9	9	0	0	0	0	3	2	1
0 to 20 ; every day 22 to 35 ; two times a week, total 25 times	46, 53 and 60	4		7	11	11	12	11	10	5	7	9	10	10	9	0	0	0	1	5	5	4
		5		5	12	12	13	12	11	2	7	8	10	10	9	0	0	0	0	5	4	2

Table 9. Antibody titer to sheep and goat red cells of animals pretreated 40 times during 65 days after birth and challenged later with goat red cells

Pretreatment	Challenge	Rabbit No.	Antibody titer (1:2 ⁿ) ; n																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
			Anti goat red cell				Anti sheep red cell																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			Hemolysin		Agglutinin		Hemolysin		Agglutinin																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
Intraperitoneal injection of goat red cells (40%, 1ml) on days after birth	Intravenous injection of goat red cells (10%, 1ml) on days after birth	Days after birth	84	91	98	107	114	84	91	98	107	114	84	91	98	107	114																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
			9	10	10	10	10	0	2	4	7	6	12	12	12	12	11	9	9	9	9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
			13	14	14	13	13	7	7	7	7	7	14	15	15	14	14	10	11	12	10	10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
			9	10	11	12	11	1	3	7	9	8	10	11	13	14	13	8	8	9	11	11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
0 to 29 ; every day 30 to 65 ; 2 times a week total 40 times	85, 92 and 99	831																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								

Table 10. Antibody titer to sheep and goat red cells of animals pretreated 35 times during 55 days after birth and challenged later with goat red cells

Pretreatment	Challenge	Rabbit No.	Antibody titer (1:2 ⁿ) ; n														
Intraperitoneal injection of goat red cells (40%, 1 ml) on days after birth	Intravenous injection of goat red cells (10%, 1 ml) after birth		Anti goat red cell										Anti sheep red cell				
			Hemolysin					Agglutinin					Hemolysin		Agglutinin		
			Days after birth	104	116	123	131	138	104	116	123	131	138	104	131	104	131
0 to 20 ; every day	110, 117	1		8	9	9	9	8	0 >	0 >	0 >	0 >	0 >	9	9	6	7
22 to 55 ; 14 times	and	2		8	8	10	10	10	0 >	1	2	4	0	9	10	6	7
total 35 times	124																

Table 11. Absorption test

Antigen for testing	Antigen for absorption	Reaktion	Antibody titer	
			No. 1	No. 2
Goat red cell	.	L	1 : 256	1 : 512
		A	1 : 1 >	1 : 16
	GPK	L	1 : 1 >	1 : 32
		A	1 : 1 >	1 : 16
	Goat red cell	L	1 : 1 >	1 : 1 >
		A	1 : 1 >	1 : 1 >
	Sheep red cell	L	1 : 1 >	1 : 1 >
		A	1 : 1 >	1 : 1 >
Sheep red cell	.	L	1 : 512	1 : 1024
		A	1 : 128	1 : 128
	GPK	L	1 : 1 >	1 : 128
		A	1 : 1 >	1 : 64
	Goat red cell	L	1 : 1 >	1 : 1 >
		A	1 : 1 >	1 : 1 >
	Sheep red cell	L	1 : 1 >	1 : 1 >
		A	1 : 1 >	1 : 1 >

L ; Hemolysis

A ; Hemagglutination

GPK ; guinea pig kidney

Table 12. Anti-sheep red cells hemolysin titer of animals pretreated
25 times during 35 days after birth and challenged
later with Forssman antigen

Pretreatment	Challenge	Rabbit No.	Anti sheep red cells hemolysin titer (1:2 ⁿ) ; n				
			Days after birth				
			48	64	74	82	88
Intraperitoneal injection of F-antigen (2 ml) on days after birth 0 to 20 ; every day 22 to 35 ; 4 times total 25 times	Intravenous injection of F-antigen (2 ml) on days after birth 75 and 82	1	3	4	5	13	13
		2	6	6	8	14	14
		3	6	7	8	12	12
		4	0 >	4	4	13	14